

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 438 786**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2010** **E 10793649 (4)**97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013** **EP 2450436**54 Título: **Quimera de ADN polimerasa del fago ϕ 29**

30 Prioridad:

02.07.2009 ES 20093041345 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.01.2014

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C. Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**SALAS FALGUERAS, MARGARITA;
DE VEGA JOSÉ, MIGUEL;
LÁZARO BOLOS, JOSÉ M^a;
BLANCO DÁVILA, LUIS y
MENCIA CABALLERO, MARIO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 438 786 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Quimera de ADN polimerasa del fago $\phi 29$.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a una quimera de ADN polimerasa que comprende una región amino-terminal (N-terminal), que codifica para una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$, y una región carboxilo-terminal (C-terminal), que comprende, al menos, un dominio HhH, que se encuentran unidas mediante una secuencia de aminoácidos enlazados y a su uso para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde. Asimismo, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con dicha quimera de ADN polimerasa y un kit para llevar a cabo dicho método.

Estado de la técnica anterior

La única enzima requerida por el bacteriófago $\phi 29$ para replicar su genoma es su ADN polimerasa, una proteína monomérica de 66 KDa, capaz de catalizar tanto la iniciación de la replicación como la elongación de la cadena sintetizada. Para la iniciación, esta polimerasa se une a una proteína denominada "terminal" (TP), reconoce el extremo del ADN de $\phi 29$ y cataliza la formación de un complejo covalente TP-dAMP. Tras la polimerización de 10 nucleótidos, se disocia el heterodímero ADN polimerasa/TP y se lleva a cabo la elongación de la cadena naciente de ADN.

Las ADN polimerasas replicativas requieren la interacción con proteínas accesorias que estabilizan la unión entre la enzima y el ADN (Kuriyan y O'Donnell. *J Mol Biol.* 1993; 234: 915-925). Por otro lado, dichas ADN polimerasas necesitan acoplar la polimerización al desplazamiento de la cadena de ADN que no está siendo copiada, para lo cual requieren su asociación funcional a proteínas tipo helicasa. En este sentido, la ADN polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ presenta varias características funcionales intrínsecas que la hacen única:

- a) Elevada procesividad (definida como el número de nucleótidos incorporados por la reacción o efecto enlazante).
- b) Alta capacidad de desplazamiento o separación de hélice o cadena, lo que le permite replicar el genoma de dicho bacteriófago en ausencia de proteínas accesorias tipo helicasa. Estas dos características, procesividad y desplazamiento de cadena permiten que la ADN polimerasa de $\phi 29$ sea capaz de sintetizar cadenas o hélices de ADN de más de 70 kb de longitud (Blanco et al. *J Biol Chem.* 1989; 264: 8935-8940).
- c) Elevada precisión en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena (Esteban et al. *J Biol Chem.* 1993; 268: 27192726).

Todas estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos de procesos isotérmicos (a temperatura constante) para la amplificación del ADN de doble cadena (ADN bc), basados en el uso de esta polimerasa. En una configuración simple, la capacidad de la ADN polimerasa de $\phi 29$ para usar ADN de cadena sencilla (ADNmc) circular permite una amplificación de ADN por el método del círculo rodante (o, RCA de las siglas en inglés de rolling-circle amplification), originando moléculas de ADNmc de gran longitud y que contienen más de 10 copias del molde circular (Blanco et al. *J Biol Chem.* 1989; 264: 8935-8940; US5001050, US5198543 y US5576204). En el procedimiento de amplificación de ADNbc desarrollado por Amersham Biosciences/Molecular Staging (Dean et al. *Genome Res.* 2001; 11: 1095-1099; Dean et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 5261-5266), la combinación del uso de la ADN polimerasa de $\phi 29$ con el de hexámeros (hexa-nucleótidos) cebadores de secuencias al azar, permiten obtener factores de amplificación de 104-106 partiendo de picogramos de ADN plasmídico circular [TempliphiTM de GE Healthcare] o de 10 nanogramos de ADN genómico [GenomiphiTM de GE Healthcare y Repli-G[®] de Qiagen]. Los productos originados son de alta calidad y pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa, habiéndose demostrado que la ADN polimerasa de $\phi 29$ es la enzima más robusta para este fin. El tampón habitual para llevar a cabo las reacciones de amplificación con la ADN polimerasa de $\phi 29$ contiene Tris-HCl (pH 7, 5) más distintas concentraciones (en el orden milimolar) de NaCl o KCl y $MgCl_2$ (US20030207267). Sin embargo, a pesar de la bondad de estos protocolos en situaciones muy diversas, es una necesidad creciente el desarrollar otros que permitan partir de cantidades menores de ADN.

Los motivos HhH ("hélice-gancho-hélice") unen el ADN independientemente de su secuencia y se encuentran en diversas ADN polimerasas, ligasas y glicosilasas (Shao y Grishin. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 2643-2650; Doherty et al. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24:2488-2497). Estos motivos contienen un par de α -hélices antiparalelas conectadas por un lazo tipo "horquilla o gancho". La segunda α -hélice no sobresale de la estructura y por lo tanto, a diferencia de otros motivos de unión al ADN, no puede intercalarse en el surco mayor del ADN. Los estudios cristalográficos sugieren que las interacciones proteína-ADN se establecen a través del "lazo" entre las dos α -hélices. Este lazo está implicado en el establecimiento de interacciones inespecíficas con el ADN, y normalmente contiene la secuencia consenso GhG, donde h es un residuo hidrofóbico, normalmente I, V, o L. La resolución de estructuras cristalográficas sugiere que las interacciones se establecen entre los nitrógenos de la cadena polipeptídica y los oxígenos de los fosfatos del ADN. Además, en las posiciones 2 y 3 respecto a la segunda G suelen existir aminoácidos polares que establecerían interacciones adicionales con los grupos fosfato. La última G de la secuencia consenso constituye la parte N-terminal de la segunda α -hélice, y el residuo hidrofóbico h contribuye a las interacciones entre las dos α -hélices del motivo. Las dos α -hélices se encuentran empaquetadas formando

entre sí un ángulo de 25-50° que dicta el patrón característico de hidrofobicidad en las secuencias. Los motivos HhH generalmente forman parte de estructuras mayores denominadas (HhH) 2, compuestas por dos motivos HhH unidos por una hélice α , formando una simetría especular respecto a la del ADN que facilita su unión estable al mismo (Shao y Grishin. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 2643-2650; Doherty et al. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24:2488-2497; Thayer et al. *EMBO J.* 1995; 14: 4108-4120) .

La formación de quimeras entre ADN polimerasas termoestables como Taq y Pfu y motivos que unen ADN de manera no específica se ha utilizado anteriormente para aumentar la capacidad de unión al ADN por dichas polimerasas. (Pavlov et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 13510-13515; WO2004013279; Wang et al. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1197-1207) .

La resolución cristalográfica de la estructura de la ADN polimerasa de $\phi 29$ ha proporcionado las bases moleculares responsables de la polimerización procesiva acoplada al desplazamiento de cadena, una característica específica de esta enzima (Kamtekar et al. 2006; *EMBO J* 25: 1335-1343) .

El análisis comparativo con otras ADN polimerasas del tipo eucariótico (familia B) muestra un plegamiento general similar: un dominio de polimerización C-terminal constituido por los subdominios universales dedos, palma y pulgar, y que forman un canal a través del cual se une el ADN; y un dominio exonucleasa 3'-5' N-terminal responsable de eliminar los nucleótidos incorporados erróneamente durante la polimerización. La principal diferencia estructural entre las ADN polimerasas de estructura conocida y la de $\phi 29$ es la presencia en esta última de dos subdominios adicionales en su dominio de polimerización, ambos correspondientes a inserciones de secuencia conservadas en el subgrupo de las ADN polimerasas que utilizan una proteína como iniciador, llamados TPR1 y TPR2. El subdominio TPR1 se encuentra situado junto al palma y contacta con el dúplex ADN. El subdominio TPR2, con una estructura de β -gancho o horquilla, forma, junto a los subdominios pulgar, palma y dedos una estructura anular que rodearía por completo el ADN de nueva síntesis, estabilizando la unión de la ADN polimerasa al ADN, requerida para replicar de manera procesiva. Asimismo, el subdominio TPR2 participa junto con los subdominios dedos, palma y el dominio exonucleasa en la formación de un canal estrecho por el que pasa la cadena molde para acceder al centro activo durante la replicación, forzando la separación de la doble cadena de ADN a medida que la polimerasa se va desplazando, actuando de manera análoga a como lo haría una helicasa y proporcionando a la polimerasa su capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de cadena (Kamtekar et al. 2006; *EMBO J* 25: 1335-1343; Rodríguez et al. 2005; *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6407-6412) . Estas diferencias tan significativas en el dominio de polimerización de la ADN polimerasa de $\phi 29$ respecto del resto, hace impredecible el efecto que la fusión de un péptido en el extremo C-terminal de la misma tendría en sus propiedades de polimerización y de unión al ADN.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una quimera de ADN polimerasa que comprende una región N-terminal, que codifica para una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$, y una región C-terminal, que comprende, al menos, un dominio HhH, que se encuentran unidas mediante una secuencia de aminoácidos conectados y al uso de la misma para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde. Asimismo, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con dicha quimera de ADN polimerasa y un kit para llevar a cabo dicho método.

La ADN polimerasa del fago $\phi 29$ presenta varias características de gran interés para la amplificación de ADN como son: una elevada procesividad sin necesidad del concurso de ninguna proteína accesoria y una alta capacidad de desplazamiento de cadena que le permiten replicar el genoma de dicho bacteriófago en un solo evento de unión al ADN, así como una alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena. Estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos para la amplificación isotérmica de ADN, basados en el uso de esta polimerasa que permiten la obtención de productos de alta calidad que pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa. Sin embargo, existe una necesidad de protocolos que permitan la amplificación de ADN a partir de cantidades menores del mismo. La presente invención responde a esta necesidad mediante dos enfoques: 1) el desarrollo de una composición que mejora significativamente la especificidad y el rendimiento de la reacción, y 2) la formación de quimeras entre la ADN polimerasa de $\phi 29$ y motivos que unen ADN de manera no específica que aumentan la capacidad de unión al ADN de la enzima.

En los ejemplos de esta patente se muestra que la adición simultánea de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 20) y una sal de amonio al tampón usado habitualmente para la amplificación con la ADN polimerasa de $\phi 29$, por un lado, evita la amplificación inespecífica de ADN y, por otro, permite la amplificación detectable y específica a partir de cantidades límite de 0, 1 femtogramos (fg) de ADN plasmídico y 10 fg de ADN genómico como molde.

Respecto al aumento de la capacidad de unión al ADN, en la presente invención se han fusionado motivos HhH de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri* al extremo carboxilo de la ADN polimerasa de $\phi 29$ a través de una secuencia conectora o enlazador, que se origina de 4 quimeras diferentes. Estas quimeras son capaces de amplificar el ADN molde a partir de una cantidad menor que la requerida por la ADN polimerasa de $\phi 29$ natural.

Un primer aspecto de la presente invención, se refiere a una quimera de ADN polimerasa (de aquí en adelante, quimera de ADN polimerasa de la invención) que comprende:

- a) una secuencia de aminoácidos que codifica para una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$, unida por su extremo C-terminal a
- b) una secuencia de aminoácidos conectados, unida por su extremo C-terminal a
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende, al menos, un dominio hélice-gancho-hélice (HhH) .

El término "ADN polimerasa", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. Generalmente, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' de un cebador hibridado con una secuencia de ADN molde, y procede en dirección al extremo 5' de la hebra del ADN molde.

El término "quimera", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos es un producto de fusión de secuencias de aminoácidos de al menos dos proteínas distintas. Una proteína quimérica generalmente se produce mediante su expresión a partir de un ADN quimérico que codifica para la secuencia de aminoácidos quimérica.

Los términos "quimera de ADN polimerasa" o "ADN polimerasa quimérica", tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a una proteína cuya secuencia de aminoácidos es un producto de fusión de secuencias de aminoácidos de al menos dos proteínas distintas, de las cuales una es una ADN polimerasa, y que es capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. La quimera de ADN polimerasa de la invención, comprende una región N-terminal, que codifica para una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (a) , y una región C-terminal, que comprende, al menos, un dominio HhH (c), que se encuentran unidas mediante una secuencia de aminoácidos conectados (b) .

El término "ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ ", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier ADN polimerasa que contiene subdominios TPR1 y TPR2 en su dominio de polimerización, que proporcionan a la polimerasa la capacidad de acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento de cadena. Ejemplos de ADN polimerasas del tipo $\phi 29$ que pueden ser empleadas en la presente invención se seleccionan de la lista que comprende las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV) .

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de (a) de la quimera de la ADN polimerasa de la invención codifica una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ que se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV) .

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de (a) de la quimera de la ADN polimerasa de la invención presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de (a) de la quimera de la invención presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1. Aún más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de (a) de la quimera de la invención es la SEQ ID NO: 1.

El dominio exonucleasa de las ADN polimerasas del tipo $\phi 29$ es conocido y puede ser modificado para reducir la actividad exonucleasa reteniendo una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de cadena. Estas ADN polimerasas modificadas son especialmente útiles para secuenciar moléculas largas.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de (a) de la quimera de la ADN polimerasa de la invención codifica una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ que presenta modificación en el dominio exonucleasa, donde dicha ADN polimerasa modificada tiene preferiblemente, menos del 10% de actividad exonucleasa y, más preferiblemente, menos del 1% de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural o "wild type". En una realización aún más preferida, dicha ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

Los motivos HhH ("hélice-gancho-hélice") son motivos de unión a ADN de manera independiente de la secuencia. Estructuralmente, los motivos HhH están constituidos por un par de α -hélices antiparalelas conectadas por un bucle de tipo gancho. Este bucle se encuentra implicado en la interacción con el ADN y, generalmente, tiene una secuencia consenso consistente en glicina-aminoácido hidrofóbico-glicina (GhG), donde h es un residuo aminoácido hidrofóbico, frecuentemente, leucina, isoleucina o valina. La última glicina de la secuencia consenso sirve como residuo N-terminal de la segunda α -hélice y el residuo hidrofóbico h contribuye a las interacciones entre las dos α -hélices del motivo.

Ejemplos de proteínas que presentan algún motivo HhH en su secuencia son, pero no se limitan a la ADN topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*, las proteínas MutY, Nth, MutM/Fpg, Nei, UvrC, DinP, RecR, UmuC, DnaE o DnIJ de *Escherichia coli* o las proteínas RAD1, RAD2, RAD10, RAD27, RAD 55, RAD 57, REV1, OGG1,

NTG1, NTG2, DIN-7 o EXO-1 de levaduras, así como los homólogos de estas proteínas en otros organismos como, por ejemplo, pero sin limitarse, *Bacillus subtilis*, *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus influenzae*, *Methanococcus jannaschii*, *Micrococcus luteus*, *Methanobacterium thermoformicum* o *Salmonella typhimurium*.

Por tanto, en una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención, comprende, al menos, un dominio HhH de una proteína que se selecciona de la lista que comprende:

- topoisomerasa V de *M. kandleri*,
- MutY, Nth, MutM/Fpg, Nei, UvrC, DinP, RecR, UmuC, DnaE o DnIJ de *E. coli*,
- RAD1, RAD2, RAD10, RAD27, RAD 55, RAD 57, REV1, OGG1, NTG1, NTG2, DIN-7 o EXO-1 de levaduras, o
- una proteína homóloga de las anteriores en *B. subtilis*, *C. elegans*, *H. influenzae*, *M. jannaschii*, *M. luteus*, *M. thermoformicum* o *S. typhimurium*.

El extremo C-terminal de la topoisomerasa V de *M. kandleri*, se encuentra organizado en 12 repeticiones de unos 50 aminoácidos cada una, denominadas dominios A-L y que presentan cada uno dos motivos HhH.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención, comprende, al menos, un dominio HhH derivado de la topoisomerasa V de *M. kandleri*, cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 2.

En una realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención es la SEQ ID NO: 3, que corresponde a la secuencia del dominio H de la topoisomerasa V de *M. kandleri*.

En otra realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención es la SEQ ID NO: 3 unida por su extremo C-terminal a la SEQ ID NO: 4, que corresponde a la secuencia del dominio H de la topoisomerasa V de *M. kandleri* unido por su extremo C-terminal al dominio I de la topoisomerasa V de *M. kandleri*.

El término "secuencia de aminoácidos conectados", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia de aminoácidos corta de, al menos, 2 aminoácidos de longitud que permite el mantenimiento de la funcionalidad de las secuencias de aminoácidos de (a) y (c) de la quimera de ADN polimerasa de la invención. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos conectados de (b) es de 6 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos conectados de (b) es SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la quimera de ADN polimerasa de la invención para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:

- a) la quimera de ADN polimerasa de la invención,
- b) un tampón,
- c) cloruro magnésico,
- d) un cebador, y
- e) nucleósido trifosfatos.

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende los elementos (a) - (e) mencionados anteriormente y que además comprende monolaurato de sorbitán polioxietilenado, una sal de amonio, una sal de potasio o una combinación de cualquiera de las anteriores.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la quimera de ADN polimerasa de la invención está a una concentración de entre 5 nM y 75 nM. En una realización más preferida, la quimera de ADN polimerasa de la invención está a una concentración de entre 25 nM y 60 nM. En una realización aún más preferida, la quimera de ADN polimerasa de la invención está a una concentración de aproximadamente 50 nM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 20) corresponde a una concentración entre el 0, 003% y el 0, 1% del volumen total de la reacción. En una realización más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado equivale a una proporción entre el 0, 006% y el 0, 05% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado equivale a una proporción entre el 0, 01% y el 0, 03% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado

equivale a una proporción de aproximadamente un 0,025% del volumen total de la reacción. Por "volumen total de la reacción", se entiende el volumen resultante tras la adición del ADN molde a la mezcla de reacción.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

- 5 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es sulfato de amonio. En una realización más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio equivale a una concentración entre 40 mM y 50 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio equivale a una concentración de aproximadamente 45 mM.
- 10 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es cloruro de amonio. En una realización más preferida, el cloruro de amonio equivale a una concentración entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio equivale a una concentración entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio equivale a una concentración de aproximadamente 90 mM.
- 15 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es acetato de amonio. En una realización más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.
- 20 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón tiene un pH entre 7,0 y 8,5. En una realización más preferida, el tampón tiene un pH entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón tiene un pH de aproximadamente 7,5.
- 25 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón es el ácido tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES. En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES equivale a un pH entre 7,0 y 8,5. En una realización aún más preferida, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES equivale a un pH entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES equivale a un pH de aproximadamente 7,5.
- 30 En una realización preferida de este aspecto del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES equivale a una concentración entre 25 mM y 50 mM. En una realización más preferida, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES equivale a una concentración entre 30 mM y 45 mM. En una realización aún más preferida, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES equivale a una concentración de aproximadamente 40 mM.
- 35 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico. En una realización más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico corresponden a una concentración entre 30 mM y 70 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico equivalen a una concentración entre 40 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico equivalen a una concentración de aproximadamente 50 mM.
- 40 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración entre 2 mM y 20 mM. En una realización más preferida, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración entre 5 mM y 15 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración de aproximadamente 10 mM.
- 45 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de entre 40 mM y 50 mM, el tampón Tris-clorhídrico, Tris-acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.
- 50 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra en una concentración de 45 mM, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES se encuentra en una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico equivale a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico equivale a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra en una concentración entre 80 mM y 100 mM, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES se encuentra a una concentración entre 30 mM y 45 mM y a un pH entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra en una concentración entre 40 y 60 mM.

En una realización todavía más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra en una concentración de 90 mM, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES se encuentra en una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra en una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra en una concentración entre 80 mM y 100 mM, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES se encuentra en una concentración entre 30 mM y 45 mM y a un pH entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra en una concentración entre 40 y 60 mM.

En una realización todavía más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra en una concentración de 90 mM, el tampón tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES se encuentra en una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico se encuentra en una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra en una concentración de 50 mM.

El término "replicación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a partir de un ADN molde.

El término "amplificación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ADN molde.

El término "secuenciación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ADN molde.

Por "poner en contacto" se entiende que el ADN molde y la mezcla de reacción se incuban en condiciones de extensión del cebador.

El término "cebador", como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse, a la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de deoxinucleótidos en el ADN molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término "cebador específico", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de deoxinucleótidos en el ADN molde que se quiere amplificar.

Por "complementaria" se entiende que el cebador puede hibridar con una región del ADN molde de forma que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferentemente, esa región tiene una complementariedad del 100% con una región del ADN molde. Esto es, cada nucleótido en la región de complementariedad con el cebador puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en el molde de hebra sencilla. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que cebadores que posean una región con complementariedad menor al 100% respecto al ADN molde funcionarán para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

El término "cebador arbitrario" se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde. Por lo general, en el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención se emplea una población de cebadores arbitrarios. El término "cebadores arbitrarios" se refiere a un conjunto de cebadores con una secuencia aleatoria y que se usan para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es específico.

5 En otra realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es arbitrario. Preferiblemente, el cebador arbitrario está protegido frente a la acción de las exonucleasas 3'-5'. Y más preferiblemente, el cebador arbitrario es un oligonucleótido de 6 nucleótidos, "hexanucleótido" o "hexámero" protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

La expresión "protegido frente a la acción de las exonucleasas", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador modificado de forma que es resistente a la degradación nucleolítica por cualquier actividad de la exonucleasa 3'-5' presente en la quimera de ADN polimerasa de la invención.

10 En el método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, puede emplearse más de un cebador, pudiendo emplearse cebadores específicos y/o arbitrarios.

15 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador se encuentra en una concentración entre 2 μM y 100 μM . En una realización más preferida, el cebador está en una concentración entre 20 μM y 80 μM . En una realización aún más preferida, el cebador está en una concentración entre 40 y 60 μM . En una realización aún más preferida, el cebador está en una concentración de aproximadamente 50 μM .

El término "nucleósido trifosfatos", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y tres grupos fosfato.

20 El término nucleósido trifosfatos incluye desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse a dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. Preferiblemente, los desoxinucleósido trifosfatos son dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Aún más preferiblemente, estos cuatro dNTPs están en condiciones equimolares. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los desoxinucleósido trifosfatos están en una concentración entre 100 μM y 800 μM . En una realización más preferida, los desoxinucleósido trifosfatos están en una concentración entre 200 μM y 600 μM . En una realización aún más preferida, los desoxinucleósido trifosfatos se encuentran en una concentración de aproximadamente 500 μM .

25 El término nucleósido trifosfatos también incluye dideoxinucleósido trifosfatos (ddNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse a ddATP, ddCTP, ddITP, ddUTP, ddGTP, ddTTP, o derivados de los mismos.

30 En algunas realizaciones preferidas del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. El nucleósido marcado puede ser, por ejemplo, un deoxinucleósido trifosfato o un dideoxinucleósido trifosfato. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

35 El término "ADN molde", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN que puede servir como sustrato para la síntesis de una cadena de ADN complementaria; es decir, se refiere a una molécula de ADN que va a ser replicada, amplificada o secuenciada. En una realización preferida el ADN molde es ADN plasmídico. En otra realización preferida, el ADN molde es ADN genómico.

La replicación, la amplificación o la secuenciación del ADN molde se lleva a cabo en condiciones de extensión de cebador. La expresión "condiciones de extensión de cebador" hace referencia a las condiciones en que puede tener lugar la síntesis dependiente de ADN molde iniciada en un cebador.

40 La síntesis de un ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

45 Por "condiciones isotérmicas" se entiende temperatura esencialmente constante. Preferiblemente, la síntesis del ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención tiene lugar a una temperatura esencialmente constante. Más preferiblemente, a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 40° C, y aún más preferiblemente, de aproximadamente 30° C.

50 Son conocidos en el estado de la técnica un amplio número de métodos que permiten la amplificación de ADN. Algunos métodos requieren un proceso de ciclado térmico como, por ejemplo, pero sin limitarse, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros métodos no requieren un proceso de ciclado térmico, sino que se realizan a una temperatura esencialmente constante como, por ejemplo, pero sin limitarse, la amplificación por círculo rodante (RCA), la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación mediante lazo (LAMP). La amplificación de un ADN molde según el método de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

Preferiblemente, la amplificación del ADN molde según el método de amplificación de la presente invención tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA) , mediante amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) , amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMPA) .

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende elementos apropiados para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención que comprende:

- 10 a) la quimera de ADN polimerasa de la invención,
b) un tampón, y
c) cloruro magnésico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además monolaurato de sorbitán polioxietileno, una sal de amonio, una sal de potasio o una combinación de cualquiera de las anteriores.

Preferiblemente, dicha sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

15 Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además un cebador. En una realización más preferida, el cebador es un cebador arbitrario que está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'5'.

20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además nucleósido trifosfatos. Por ejemplo, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además deoxinucleósido trifosfatos y/o un dideoxinucleósido trifosfato.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador marcado. El nucleósido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un dideoxinucleósido trifosfato.

25 El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra el efecto del Tween® 20 y del (NH₄)₂SO₄ en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de φ29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb) . Después de incubar a 30° C durante 5 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. A la izquierda, los fragmentos de ADN lineales obtenidos después de la digestión del ADN de φ29 con HindIII, usados como marcadores de longitud del ADN.

40 La Figura 2 muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN plasmídico (en el orden de femtogramos) por la ADN polimerasa de φ29 en presencia de Tween® 20 y (NH₄)₂SO₄. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween® 20 al 0, 025% y de (NH₄)₂SO₄ 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

45 La Figura 3 muestra el efecto del ión NH₄ en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de φ29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween® 20 al 0, 025% y de la sal de amonio indicada así como de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4, 2 kpb) . Después de incubar a 30° C durante 6 horas, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

La Figura 4 muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN genómico de Bacillus subtilis por la ADN polimerasa de φ29 en presencia de Tween® 20 y (NH₄)₂SO₄. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto

principal, en presencia de Tween® 20 al 0, 025% y de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

La Figura 5 muestra la notable mejora que representa el añadir Tween® 20 al 0, 025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al actual tampón de reacción de un kit comercial para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de $\phi 29$ (Ilustra kit de General Electrics HealthCare) . El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

La Figura 6 muestra un esquema de las diferentes etapas seguidas para construir las quimeras HAY, HGT, HIAY y HIGT.

La Figura 7 muestra el retraso en gel de las moléculas de ADN cebador/molde por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quimérica. La molécula hibridada de 15 bases/21 bases marcada en 5' (ADNbc) se incubó con ADN polimerasa de $\phi 29$ natural o con la ADN polimerasa quimérica indicada, en las condiciones descritas en el texto. Las movibilidades del ADNbc libre y del complejo de polimerasa-ADN se detectaron por autorradiografía tras su separación por electroforesis en geles nativos de poli(acrilamida) al 4% (w/v) (80:1 monómero: bisacrilamida).

La Figura 8 muestra la replicación procesiva de ADN por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quimérica. (A) Replicación de ADN de M13 acoplado al desplazamiento de cadena por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quimérica. La replicación de 250 ng de ADN de M13 con un solo cebador se llevó a cabo como se ha descrito en el texto, usando ADN polimerasas de $\phi 29$ natural o quimérica (30 nM) . La posición del ADN de M13 de unidad de longitud se muestra a la derecha. (B) Síntesis procesiva por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quimérica. El ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones que en (A), usando concentraciones decrecientes de la ADN polimerasa indicada. Después de incubar a 30° C durante 20 min, las muestras se procesaron como se ha descrito en (A).

La Figura 9 muestra la amplificación por círculo rodante con cebado múltiple de 10 fg de ADN plasmídico por las ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quimérica. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de tampón B y 50 nM de la ADN polimerasa indicada. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

La Figura 10 muestra la amplificación del genoma entero con cebado múltiple de 100 fg de ADN genómico de *B. subtilis* con ADN polimerasas de $\phi 29$ natural y quimérica. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto en presencia de tampón B y 50 nM de la ADN polimerasa indicada. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención.

Ejemplo 1

Optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación de ADN con cebado múltiple por la ADN polimerasa de $\phi 29$

Se ha demostrado que la ADN polimerasa de $\phi 29$ realiza una amplificación de 104-106 veces partiendo de varios picogramos de ADN circular. Para este fin se empleó un tampón de reacción que contiene Tris-HCl 40 mM, pH 7, 5, KCl 50 mM y MgCl_2 10 mM (en lo sucesivo Tampón A) . Después de probar la influencia de diferentes condiciones de detergentes y sales en la capacidad de amplificación de ADN de la ADN polimerasa de $\phi 29$, encontramos que la adición simultánea de Tween®20 al 0, 025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al Tampón A mejora mucho la amplificación de cantidades limitadas de ADN aportado.

Condiciones de la reacción de amplificación de ADN plasmídico. La mezcla de incubación contenía 12,5 μl de tampón A, 50 μM de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500 μM de cada uno de los deoxinucleósido trifosfatos (dCTP, dGTP, dTTP y dATP) , las cantidades indicadas de un ADN plasmídico (con un tamaño de 4,2 kbp) y, donde se indica, se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM o Tween® 20 al 0, 025% o una combinación de ambos. La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95° C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de $\phi 29$ 50 nM y se detuvo después de la incubación a 30° C mediante calentamiento a 65° C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 μl de las reacciones, se digirió el ADN amplificado con la endonucleasa de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0, 7%. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.

Condiciones de la reacción de amplificación de ADN genómico. La mezcla de incubación contenía 12, 5 µl de tampón A, (NH₄)₂SO₄ 45 mM, Tween® 20 al 0, 025%, 50 µM de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500 µM de cada uno de los deoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP) y las cantidades indicadas de ADN genómico de *Bacillus subtilis* (con un tamaño de 4 Mpb). La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95° C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de φ29 50 nM y se detuvo después de la incubación a 30° C mediante el calentamiento a 65° C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 µl de las reacciones y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0, 7%. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.

La Figura 1 muestra el efecto de añadir (NH₄)₂SO₄ 45 mM y Tween® 20 al 0, 025% en la amplificación de cantidades pequeñas del ADN plasmídico aportado. Como se muestra, la ADN polimerasa de φ29 no dio ningún producto de amplificación detectable con el Tampón A estándar cuando se usaron 100 fg de ADN. En estas condiciones de reacción, la adición de Tween® 20 al 0, 025% en ausencia de ADN causó la aparición de productos de ADN en forma de trazas, probablemente como una consecuencia de la amplificación inespecífica de ADN causada por la hibridación y elongación de los cebadores hexámeros aleatorios. Las mismas trazas se observaron con 10 fg del ADN aportado. Sin embargo, en presencia de 100 fg de ADN, la adición de Tween® 20 al 0, 025% permitió que la ADN polimerasa de φ29 produjera una cantidad detectable de plásmido amplificado. La producción total de ADN amplificado, específico o inespecífico, indica que la adición de Tween® 20 al 0, 025% al Tampón A potencia la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de φ29. Se observó un efecto similar con el detergente NP40. Por el contrario, otros detergentes analizados como el Tritón X100 y el Tritón X114 no potenciaban la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de φ29 (no se muestra). La adición simultánea de Tween® 20 al 0, 025% y de (NH₄)₂SO₄ 45 mM al tampón A tenía dos consecuencias en el rendimiento y la especificidad de los productos amplificados: 1) no se detectó amplificación de ADN en ausencia de ADN aportado; 2) se obtuvieron por amplificación varios µg de ADN plasmídico de unidad longitud, incluso cuando la cantidad de ADN aportado era tan baja como 10 fg. Como control, la adición de (NH₄)₂SO₄ 45 mM al Tampón A no produjo ninguna mejoría en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de φ29.

Por lo tanto, podemos concluir que la adición simultánea de Tween® 20 al 0, 025% y (NH₄)₂SO₄ 45 mM al Tampón A (en lo sucesivo Tampón B) produce una clara optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación con cebado múltiple de ADN circular por la ADN polimerasa de φ29, siendo ambos reactivos absolutamente necesarios para amplificar cantidades limitadas (10 fg) del ADN aportado. De hecho, como puede verse en la Figura 2, el uso del Tampón B permitió a la ADN polimerasa de φ29 sintetizar microgramos de ADN usando una cantidad de plásmido aportado tan baja como 0, 1 fg (~24 moléculas) después de 6 horas de reacción. Como control de calidad, la digestión de los productos de amplificación con EcoRI generó fragmentos de ADNbc lineales de 4, 2 kb, que indicaban que los productos de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original. Otra vez, el Tampón B también evitó la amplificación de ADN inespecífico (véase en la Figura 2 las fases que corresponden a las reacciones llevadas a cabo sin el ADN aportado).

La Figura 3 muestra el efecto de los iones amonio y del Tween® 20 al 0, 025% en mejorar la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones anteriormente comentadas en presencia Tween® 20 al 0, 025% y de la sal de amonio indicada. Como se puede observar en la figura 3 tanto el NH₄ Cl como el NH₄CH₃COO tenían un efecto similar al (NH₄)₂SO₄, tanto en el rendimiento como en la especificidad de los productos amplificados. Este resultado indica que el efecto anteriormente descrito del (NH₄)₂SO₄ en la amplificación de cantidades limitadas de ADN plasmídico es debido a los iones NH₄⁺.

Para determinar si las condiciones optimizadas descritas antes también se aplicaban a la amplificación del ADN genómico, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos realizados en presencia de concentraciones limitadas de ADN genómico de *B. subtilis* (4 Mpb en longitud). Como se muestra en la Figura 4, la presencia de Tween® 20 al 0, 025% y (NH₄)₂SO₄ 45 mM en el tampón B, por una parte evitaba la amplificación inespecífica del ADN (fases sin ADN aportado), y por otra parte, permitía a la ADN polimerasa de φ29 dar una amplificación detectable y específica del ADN genómico incluso cuando se usaban 10 fg de ADN aportado, es decir, una cantidad 106 veces inferior a la recomendada en los actuales kits de amplificación genómica comerciales.

Para determinar si la adición simultánea de Tween® 20 al 0, 025% y (NH₄)₂SO₄ mM incrementa la eficiencia de amplificación de los actuales kits comerciales para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de φ29, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos de amplificación del ADN plasmídico descrito en las Figuras 1, 2 y 3. En la Figura 5 se muestra la notable mejora que representa el añadir Tween® 20 al 0, 025% y (NH₄)₂SO₄ 45 mM al actual tampón de reacción del kit Illustra (GE HealthCare). Como se puede observar, siguiendo las recomendaciones del proveedor, con el kit Illustra sólo se pueden amplificar de manera detectable en gel de agarosa cantidades de plásmido iguales o superiores a 10 pg. Por el contrario la adición simultánea de Tween® 20 al 0, 025% y (NH₄)₂SO₄ al tampón de reacción del kit Illustra disminuye de manera notable la cantidad necesaria de ADN que puede amplificarse, observándose productos de amplificación desde 1 fg aportado de ADN plasmídico, suponiendo una mejora de cuatro órdenes de magnitud en la amplificación.

Ejemplo 2

Mejora de la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$ por adición de dominios HhH

Se fusionó la ADN polimerasa de $\phi 29$ con uno o dos dominios HhH para construir nuevas ADN polimerasas con una capacidad de unión al ADN mejorada, la cual permita usar menores cantidades de ADN aportado. La inspección de la estructura de la ADN polimerasa de $\phi 29$ llevó a seleccionar la fusión de los dominios HhH con el extremo C-terminal de la enzima, puesto que este extremo (el final del subdominio pulgar) se encuentra justo a la entrada del túnel del ADNbc secuencia arriba. La fusión de los dominios HhH con el extremo N-terminal de la ADN polimerasa de $\phi 29$ habría comprometido la capacidad intrínseca del desplazamiento de la cadena, ya que los datos bioquímicos y estructurales demostraban que el desarrollo del ADN original tiene lugar cerca del extremo amino. Además, la colocación de los dominios HhH en el extremo N-terminal no sería la adecuada para mejorar la unión de la parte del ADNbc formada por la hibridación del cebador hexámero con el ADN molde. En este sentido, la fusión de una secuencia (His) 6 en el extremo N-terminal de la ADN polimerasa de $\phi 29$ tiene un efecto perjudicial en la amplificación.

2.1 ADN polimerasa quimérica

Para hacer las quimeras HIAY y HIGT, se encargó a la GenScript Corporation la síntesis de un fragmento de ADN que contenía los nucleótidos que codifican los dominios HhH, H (56 aminoácidos) e I (51 aminoácidos) de la Topoisomerasa V de *M. kandleri* (código en GenBank AF311944 y (Pavlov et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 13510-13515), y éste se clonó entre los sitios EcoRV del vector comercial pUC57. El plásmido resultante pUC57-HhH se usó como molde para amplificar por PCR un fragmento de ADN que codifica los dominios H e I. Por lo tanto, el cebador 3 (SEQ ID NO: 7) junto con los cebadores 1 (SEQ ID NO: 8) o 2 (SEQ ID NO: 9) dieron los fragmentos de ADN I y II de 369 pb, respectivamente. Además de un sitio KasI introducido por ambos cebadores, el cebador 1 también introducía la secuencia que codifica el conector SEQ ID NO: 5 (Pavlov et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 13510-13515), mientras que el cebador 2 introducía la secuencia de nucleótidos que codifica el conector SEQ ID NO: 6 (un derivado del conector SEQ ID NO: 10 previamente descrito en Sun et al. Proteins. 2006; 65: 231-238). El cebador 3 contenía la secuencia que codifica los 6 residuos de histidina, seguidos de un codón de parada y un sitio BamHI (véase en la Figura 6 un esquema simplificado de las ADN polimerasas quiméricas).

En paralelo, se usó un derivado del plásmido pJLw2 (Lázaro et al. Methods Enzymol. 1995; 262: 42-49) que contiene el gen que codifica la ADN polimerasa de $\phi 29$ (572 aminoácidos), como molde para una RCP llevada a cabo con el cebador 4 (SEQ ID NO: 11) que incluye un sitio 5' HindIII, y los cebadores 5 (SEQ ID NO: 12) o 6 (SEQ ID NO: 13), para obtener los fragmentos III y IV de 1757 pb, respectivamente. Los fragmentos III y IV contendrán, por lo tanto, el ADN que codifica la ADN polimerasa de $\phi 29$ seguida de las secuencias SEQ ID NO: 5 (Fragmento III) y SEQ ID NO: 6 (fragmento IV), que también incluyen un sitio KasI. Los fragmentos I-IV se purificaron en geles de agarosa al 0, 7% y después se digirieron con KasI. Los fragmentos de ADN digeridos I y III, y II y IV se ligaron con la ADN ligasa de T4 para obtener un ADN lineal de 2108 pb que codifica la quimera HIAY (Fragmento V) y HIGT (Fragmento VI), respectivamente. Los productos ligados se purificaron en geles de agarosa al 0, 7% y después se digirieron con las endonucleasas BamHI y HindIII. Los productos digeridos se purificaron por electroforesis en geles de agarosa. Los fragmentos V y VI finalmente se clonaron en el vector pT7-4 (Tabor et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 1074-1078). Las quimeras HIAY (ADN polimerasa de $\phi 29$ + conector SEQ ID NO: 5 + dominios H e I de topoV) y HIGT (ADN polimerasa de $\phi 29$ + conector SEQ ID NO: 6 + dominios H e I de topoV) se usaron como molde para construir las quimeras HGT y HAY, respectivamente, insertando un codón de parada después del fragmento H de TopoV mediante el kit de mutagénesis dirigida QuikChange® (Stratagene). La confirmación de la secuencia de ADN y la ausencia de mutaciones adicionales, se llevó a cabo mediante secuenciación del gen entero. Las ADN polimerasas quiméricas se expresaron en células BL21 (DE3) de *E. coli* que albergaban el gen quimérico clonado en un derivado de pJLw2 plasmídico, y después se purificaron esencialmente como se describe en (Lázaro et al. Methods Enzymol. 1995; 262: 42-49).

En resumen, las ADN polimerasas quiméricas obtenidas fueron las siguientes:

HAY: ADN polimerasa de $\phi 29$ -SEQ ID NO: 5-HhH H (635 aa; ~73 kDa)

HGT: ADN polimerasa de $\phi 29$ -SEQ ID NO: 6-HhH H (635 aa; ~73 kDa)

HIAY: ADN polimerasa de $\phi 29$ -SEQ ID NO: 5-HhH H-I (692 aa; ~80 kDa)

HIGT: ADN polimerasa de $\phi 29$ -SEQ ID NO: 6-HhH H-I (692 aa; ~80 kDa)

2.2. Capacidad de unión al ADN de las ADN polimerasas quiméricas

Para determinar si la fusión de los motivos HhH al extremo de la ADN polimerasa de $\phi 29$ confería una mejor capacidad de unión de las quimeras al ADN, se llevó a cabo el análisis en gel de retraso de la movilidad electroforética del ADN.

Condiciones del ensayo. Los oligonucleótidos de 15 bases (SEQ ID NO: 14J) y de 21 bases (SEQ ID NO: 15J), que tienen una extensión 5' de seis nucleótidos además de la secuencia complementaria al oligonucleótido de 15 bases, fueron suministrados por Isogen. El oligonucleótido de 15 bases se marcó en 5' con [γ - 32 P] ATP y el polinucleótido quinasa de T4. El oligonucleótido de 15 bases marcado en 5' se hibridó con el de 21 bases en presencia de NaCl 0,2 M y tris-HCl 60 mM (pH 7, 5). La molécula híbrida de oligonucleótido de 15 bases marcada en el 5'/oligonucleótido de 21 bases se usó para analizar la interacción con las ADN polimerasas de ϕ 29, naturales o quiméricas. La mezcla de incubación, en un volumen final de 20 μ l, contenía tris-HCl 50 mM (pH 7, 5), ditiotritol 1 mM, MgCl₂ 10 mM, sulfato amónico 20 mM, 0, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), glicerol al 4%, molécula de oligonucleótidos de 15 bases/21 bases 1 nM, y la concentración indicada de la ADN polimerasa de ϕ 29 natural o quimérica. Después de un periodo de incubación de 5 minutos a 4° C, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% (p/v) (monómero: bis 80:1), que contenían tris-acetato 12 mM (pH 7, 5) y EDTA 1 mM y se desarrollaron a 4° C en el mismo tampón a 8 V/cm, esencialmente como describen (Carthew et al. Cell. 1985; 43: 439-448). Después de la autorradiografía, el complejo de polimerasa-ADNbc se detectó como un desplazamiento de la movilidad (retraso) en la posición de migración del ADN marcado.

En estas condiciones, la ADN polimerasa de ϕ 29 natural produce una sola banda de retraso usando la molécula híbrida de oligonucleótidos de 15 bases/21 bases marcada (véase la Figura 7) que se ha interpretado como un complejo estable de enzima-ADN competente para la polimerización (Méndez et al. J Biol Chem. 1994; 269: 30030-30038). Las quimeras HAY, HGT y HIGT mostraron una capacidad de unión al ADN mayor que la enzima natural, ya que la mayor parte del sustrato se desplazó con una concentración 9, 5 nM, a diferencia de la ADN polimerasa natural que necesitaba una concentración aproximadamente 2 veces mayor. La quimera HIAY presentaba una capacidad de unión al ADN similar o incluso menor que la de la polimerasa natural. A partir de estos resultados, se puede concluir que, en general, la adición al extremo C-terminal de la ADN polimerasa de ϕ 29 de los dominios HhH H y H+I de Topo V confiere una mejor capacidad de unión al ADN, aunque hay excepciones como es el caso de la quimera HIAY.

2.3. Replicación por círculo rodante por las ADN polimerasas quiméricas

Para determinar si la mejora en la unión del ADN obtenida por adición de los dominios HhH de la TopoV al extremo C-terminal de la ADN polimerasa de ϕ 29 afectaba por un lado a la actividad de polimerización, y por otro a la síntesis procesiva de ADN acoplada al desplazamiento de cadena, se llevaron a cabo ensayos de replicación con cebador de M13 en los que la ADN polimerasa empieza la polimerización a partir del grupo 3'-OH de un oligonucleótido de ADN. En este ensayo, el primer ciclo de replicación no requiere desplazamiento de cadena, pero una vez completado, la polimerasa encuentra el extremo 5' del cebador, requiriendo así un desplazamiento activo para continuar los siguientes ciclos de replicación (tipo círculo rodante).

Condiciones del ensayo. El ADNmc de M13mp18 se hibridó con el cebador universal en presencia de NaCl 0, 2 M y tris-HCl 60 mM (pH 7, 5), y la molécula resultante se usó como un cebador/molde para analizar la polimerización de ADN procesiva acoplada al desplazamiento de cadena por las ADN polimerasas quiméricas. La mezcla de incubación contenía en 25 μ l, tris-HCl 50 mM (pH 7, 5), MgCl₂ 10 mM, ditiotritol 1 mM, glicerol al 4%, 0, 1 mg/ml de BSA, 40 μ M de dCTP, dGTP, dTTP, y [α - 32 P]dATP (1 μ Ci), 250 ng de ADNmc de M13mp18 cebado con el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO: 16, y ADN polimerasa de ϕ 29 natural o quimérica 30 nM. Después de los periodos de incubación durante los tiempos indicados a 30° C, las reacciones se detuvieron por adición de EDTA 10 mM-SDS al 0, 1%, y las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido. Para el análisis de tamaños, el ADN marcado se desnaturizó por tratamiento con NaOH 0,7 M y se sometió a electroforesis en geles alcalinos de agarosa al 0, 7% como se describe en (McDonell et al. J Mol Biol. 1977; 110: 119-146). Después de la electroforesis, se detectó el ADNmc de M13mp8 de unidad de longitud por tinción con bromuro de etidio, y después los geles se secaron y se sometieron a una autorradiografía.

Como se muestra en la Figura 8A, un descubrimiento importante es que la presencia de los dominios HhH no interfiere con la capacidad de desplazamiento de cadena de las ADN polimerasas quiméricas. La cantidad de ADN sintetizado por las quimeras HAY, HGT, HIAY y HIGT era mayor que la sintetizada por la ADN polimerasa de ϕ 29 natural (4, 5, 5 y 7 veces, respectivamente). La velocidad de replicación era similar (en el caso de las quimeras HAY y HGT) o incluso más rápida (quimeras HIGT y HIAY) que la obtenida con la ADN polimerasa de ϕ 29 natural. Este resultado indica que la presencia de dominios HhH en el extremo C-terminal de la ADN polimerasa de ϕ 29 en las quimeras mejora el uso del ADN molde durante la replicación por círculo rodante.

2.4. Polimerización procesiva por las ADN polimerasas quiméricas

La ADN polimerasa de ϕ 29 es un paradigma para la replicación procesiva de ADN, puesto que es capaz de incorporar más de 70 kb sin disociarse del ADN en ausencia de proteínas auxiliares. Por lo tanto, se analizó si la fusión de los dominios HhH en el extremo C-terminal de la ADN polimerasa de ϕ 29 en las ADN polimerasas quiméricas afectaba a la procesividad de la polimerización.

Condiciones del ensayo. La procesividad de las ADN polimerasas quiméricas se analizó con diferentes proporciones de enzima/ADN. La mezcla de incubación contenía, en 25 μ l, tris-HCl 50 mM, (pH 7, 5) , MgCl₂ 10 mM, ditiotritol 1 mM, glicerol al 4%, 0, 1 mg/ml de BSA, 40 μ M de dCTP, dGTP, dTTP, y [α -³²P]dATP (1 μ Ci), 250 ng de ADNmc de M13mp18 cebado, y las cantidades decrecientes indicadas de la ADN polimerasa de ϕ 29 natural o ADN polimerasas quiméricas. Después de incubar durante 20 min a 30° C, las reacciones se pararon por adición de EDTA 10 mM-SDS al 0, 1%, y las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50. Para el análisis de tamaños, el ADN marcado se desnaturizó por tratamiento con NaOH 0, 7 M y se sometió a electroforesis en geles de agarosa alcalina al 0, 7%. Se evaluó la procesividad de la polimerización por análisis de la longitud de los productos de replicación con proporciones decrecientes de ADN polimerasa/ADN.

Como se muestra en la Figura 8B, proporciones decrecientes de enzima/ADN no alteraban la longitud de los productos de elongación sintetizados por las ADN polimerasas de ϕ 29 natural o quiméricas, de acuerdo con un modelo de polimerización procesiva de ADN.

2.5. Amplificación por círculo rodante (RCA) con cebado múltiple de ADN plasmídico por las ADN polimerasas de ϕ 29 natural y quiméricas

Como se ha descrito antes, tanto la alta procesividad como la capacidad de desplazamiento de cadena que posee la ADN polimerasa de ϕ 29 fueron la base para el desarrollo por Amersham Biosciences/Molecular Staging de uno de los procedimientos más eficaces para la amplificación de ADNmc isotérmica, en el que la ADN polimerasa de ϕ 29 combinada con cebadores hexámeros aleatorios logra la amplificación isotérmica y precisa de 104 a 106 veces por desplazamiento de cadena de picogramos de plásmidos circulares [TempliphiTM (www.gehealthcare.com)]. Los resultados con una ADN polimerasa de ϕ 29 que contenía una secuencia (His)₆ fusionada en su extremo C-terminal mostraban que a pesar de su eficacia durante la replicación por círculo rodante con un solo cebador, era incapaz de dar productos de amplificación detectables durante la RCA con cebado múltiple. Lo mismo era cierto para otros derivados mutantes de la ADN polimerasa de ϕ 29 que mostraban mayor afinidad por los dNTP, replicando el ADN de M13 al nivel de la ADN polimerasa natural, pero no podían dar productos de amplificación. Por lo tanto, aunque la fusión de dominios HhH al extremo C-terminal de la ADN polimerasa de ϕ 29 mejoraba la capacidad intrínseca de la enzima natural para realizar la replicación por círculo rodante con un solo cebador, no se podía anticipar un aumento similar de eficacia durante la RCA con cebado múltiple.

Condiciones del ensayo. La mezcla de incubación contenía, en 12, 5 μ l de tampón B, 10 fg de ADN plasmídico (4, 2 kpb) como suministro. Para desnaturizar el ADN aportado, las muestras se incubaron durante 3 min a 95° C y después se enfriaron en hielo durante 5 min. Las reacciones se iniciaron por adición de ADN polimerasa de ϕ 29 natural o quimérica 50 nM. Después de un periodo de incubación a 30° C durante los tiempos indicados, las reacciones se pararon por incubación de las muestras durante 10 min a 65° C. Se digirió 1 μ l de cada reacción con EcoRI y después se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0, 7%. Después de la electroforesis, el ADN amplificado se detectó por tinción con bromuro de etidio.

Como se muestra en la Figura 9, la ADN polimerasa de ϕ 29 natural dio un producto de amplificación detectable a partir de 4 horas de reacción. La quimera HAY dio un producto de amplificación detectable a partir de 4 h, siendo la cantidad total de amplificación producida al cabo de 5 horas el doble de la obtenida con la ADN polimerasa de ϕ 29 natural. La quimera HGT produjo una cantidad de ADN amplificado comparable a la obtenida con la quimera HAY; es interesante que el rendimiento de amplificación máximo se obtuviera en el tiempo de reacción más corto (3 h). La cantidad máxima de ADN amplificado con las quimeras HIAY y HIGT era similar a la obtenida con la ADN polimerasa de ϕ 29 natural, aunque como en el caso de la quimera HGT, dicho rendimiento máximo se alcanzó a partir de las 3 horas de reacción. Después de la digestión con EcoRI del ADN sintetizado con las cuatro quimeras, más del 80% del ADN amplificado dio un fragmento de ADNbc de 4, 2 kb, que indicaba que la mayor parte del producto de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original.

Este resultado indica una mayor capacidad de las ADN polimerasas quiméricas que la ADN polimerasa de ϕ 29 natural para amplificar cantidades limitadas (10 fg) del ADN plasmídico.

2.6 Amplificación del ADN con cebado múltiple de ADN genómico por las ADN polimerasas de ϕ 29 natural y quiméricas

Además de la tecnología RCA con cebado múltiple descrita antes, se desarrolló un procedimiento de amplificación de genoma entero, llamado Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA), basado en las propiedades de la ADN polimerasa de ϕ 29 combinadas con el uso de cebadores hexámeros aleatorios (Dean et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 5261-5266). Los kits GenomiphiTM (GE Healthcare) y Repli-G® (Qiagen), basados en este procedimiento, requieren una cantidad mínima de 10 ng de ADN genómico. Para investigar si las ADN polimerasas quiméricas tienen mejor capacidad para amplificar cantidades limitadas de ADN genómico con respecto a la ADN polimerasa ϕ 29 natural, se realizó un MDA del ADN genómico de B. subtilis.

Condiciones del ensayo. La mezcla de incubación contenía, en 12, 5 µl de tampón B, 100 fg de ADN genómico de *B. subtilis*. Para desnaturalizar el ADN, las muestras se incubaron durante 3 min a 95° C y después se enfriaron con hielo durante 5 min. Las reacciones se iniciaron por adición de la ADN polimerasa de ϕ 29 natural o quimérica 50 nM. Después del periodo de incubación a 30° C durante los tiempos indicados, las reacciones se pararon incubando las muestras durante 10 min a 65° C. Se analizó 1 µl de cada reacción por electroforesis en geles de agarosa al 0, 7%. Después de la electroforesis, el ADN amplificado se detectó por tinción con bromuro de etidio.

Como se muestra en la Figura 10, en las condiciones experimentales descritas antes, la ADN polimerasa de ϕ 29 natural dio productos de amplificación detectables después de 5 h de incubación. La quimera HAY también produjo productos de amplificación en este tiempo, pero la cantidad total de ADN amplificado después de 6 horas fue mucho mayor que la obtenida con la ADN polimerasa de ϕ 29 natural. Como puede observarse también, el resto de las quimeras, HGT, HIAY y HIGT dieron productos de amplificación claros en el tiempo más corto ensayado (3 h), siendo la cantidad total amplificada en este momento similar a (HIAY y HIGT) o mucho mayor (HGT) que la observada después de 6 horas con la ADN polimerasa de ϕ 29 natural. Estos resultados indican que la presencia de los dominios HhH dota a las ADN polimerasas quiméricas de una mejor capacidad para amplificar el ADN genómico con respecto a la ADN polimerasa de ϕ 29 natural.

2.7 Medida de la exactitud de las ADN polimerasas quiméricas

3 µl de cada una de las muestras del experimento mostrado en la Figura 9, correspondiente a la amplificación múltiple por círculo rodante de 10 fg de ADN plasmídico fueron incubadas en presencia de 17 µl de la mezcla de restricción (2 µl New England Biolabs (NEB) 10X EcoRI Buffer, 0, 5 µl [10 unidades] de la endonucleasa EcoRI de NEB y 14,5 µl H₂O) para obtener monómeros lineales del plásmido amplificado. Después de incubar durante 1 hora a 37°C, el ADN se purificó a través de las columnas del kit de extracción en gel Qiagen y se eluyó en 30 µl de tampón TE (tris-HCl 10 mM (pH 7, 5), EDTA 1 mM). 10 µl de cada elución fueron religados en una incubación con 2 µl de tampón NEB 10X Ligase, 8 µl de H₂O y 0, 5 µl (200 unidades) de ADN ligasa de NEB T4. Las reacciones fueron incubadas una noche a 16° C, y con 2 µl de cada una se transformaron células competentes XL-1 Blue de *E. coli*. Aproximadamente se obtuvieron 1000 transformados con cada una de las muestras de la amplificación, mientras que no se obtuvo ninguno con muestras control que contenían 10 fg de un plásmido de 4,2 kpb, tratados de la misma manera que cada una de las muestras descritas anteriormente. Se seleccionaron dos clones de cada transformación y se purificaron y secuenciaron los plásmidos correspondientes de acuerdo con los procedimientos estándar. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación fueron: pT7-N (SEQ ID NO: 17), sp4+10 (SEQ ID NO: 18) y sp10+7 (SEQ ID NO: 19). En total, 4918 nucleótidos no solapantes de cada uno de los plásmidos amplificados por las ADN polimerasas natural y quiméricas fueron secuenciados. Los resultados se muestran en la Tabla 1 e indican una exactitud de síntesis de las ADN polimerasas quiméricas similar a la enzima natural.

Tabla 1: Exactitud de la polimerización de las ADN polimerasas de ϕ 29 natural y quiméricas

Polimerasa	Mutaciones
Natural	0
HAY	0
HGT	0
HIAY	1 (transversión G a T)
HIGT	0

Los 4918 nucleótidos no solapantes de cada uno de los plásmidos amplificados por las ADN polimerasas natural y quimérica se muestran en el listado de secuencias tal como se ha descrito en el texto principal.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

<120> Quimera de ADN polimerasa del fago phi29

<130> P057712EP

<140> EP 10793649.4

<141> 2010-07-01

<150> ES P200930413

<151> 2009-07-02

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 572

<212> PRT

<213> Bacteriófago phi-29

<400> 1

Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr Lys Val
 1 5 10 15

Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu Asp His
 20 25 30

Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala Trp Val
 35 40 45

Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys Phe Asp Gly
 50 55 60

Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala
 65 70 75 80

Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met Gly Gln
 85 90 95

Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg Lys Ile
 100 105 110

His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro Val Lys
 115 120 125

Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp Ile Asp
 130 135 140

Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu Glu Tyr
 145 150 155 160

Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Arg Leu Leu Ile
165 170 175

Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp Ser Leu
180 185 190

Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys Val Phe
195 200 205

Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala Tyr Arg
210 215 220

Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu Ile Gly
225 230 235 240

Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln Met Tyr
245 250 255

Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly Lys Tyr
260 265 270

Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg Cys Glu
275 280 285

Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys Arg Ser
290 295 300

Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly Glu Ile
305 310 315 320

Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys Glu His
325 330 335

Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe Lys Ala
340 345 350

Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr Ile Lys
355 360 365

Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met Leu Asn
370 375 380

Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly Lys Val
385 390 395 400

Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly Glu Glu
405 410 415

Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile Thr Ala
420 425 430

Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Arg
435 440 445

Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr Glu Ile
450 455 460

Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Trp
465 470 475 480

Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Val Lys Tyr Leu Arg Gln Lys Thr
485 490 495

Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val Glu
500 505 510

Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys Cys Ala
515 520 525

Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys
530 535 540

Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly
545 550 555 560

Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
565 570

5 <210> 2
<211> 984
<212> PRT
<213> Methanopyrus kandleri

10 <400> 2

15

Met	Ala	Leu	Val	Tyr	Asp	Ala	Glu	Phe	Val	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Phe	1	5	10	15
Glu	Glu	Glu	Arg	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	Asp	Gly	20	25	30	
Val	Leu	Ala	Thr	Arg	Tyr	Leu	Met	Glu	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala	Lys	Asn	35	40	45	
Asp	Glu	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	His	Gln	Asn	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Gly	50	55	60	
Ser	Tyr	Ala	Cys	Ser	Ile	Asp	Pro	Thr	Glu	Asp	Arg	Tyr	Gln	Asn	Val	65	70	75	80
Ile	Val	Arg	Gly	Val	Asn	Phe	Asp	Glu	Arg	Val	Gln	Arg	Leu	Ser	Thr	85	90	95	
Gly	Gly	Ser	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ile	Val	Tyr	Arg	Arg	Gly	Trp	Arg	100	105	110	
Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Glu	Asp	Val	Pro	Ala	Ile	115	120	125	
Glu	Val	Arg	Ala	Val	Lys	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Pro	Ala	Leu	Tyr	Arg	130	135	140	
Ile	Leu	Val	Arg	Tyr	Gly	Arg	Val	Asp	Leu	Met	Pro	Val	Thr	Val	Asp	145	150	155	160
Glu	Val	Pro	Pro	Glu	Met	Ala	Gly	Glu	Phe	Glu	Arg	Leu	Ile	Glu	Arg	165	170	175	

5

10

Tyr Asp Val Pro Ile Asp Glu Lys Glu Glu Arg Ile Leu Glu Ile Leu
 180 185 190

Arg Glu Asn Pro Trp Thr Pro His Asp Glu Ile Ala Arg Arg Leu Gly
 195 200 205

Leu Ser Val Ser Glu Val Glu Gly Glu Lys Asp Pro Glu Ser Ser Gly
 210 215 220

Ile Tyr Ser Leu Trp Ser Arg Val Val Val Asn Ile Glu Tyr Asp Glu
 225 230 235 240

Arg Thr Ala Lys Arg His Val Lys Arg Arg Asp Arg Leu Leu Glu Glu
 245 250 255

Leu Tyr Glu His Leu Glu Glu Leu Ser Glu Arg Tyr Leu Arg His Pro
 260 265 270

Leu Thr Arg Arg Trp Ile Val Glu His Lys Arg Asp Ile Met Arg Arg
 275 280 285

Tyr Leu Glu Gln Arg Ile Val Glu Cys Ala Leu Lys Leu Gln Asp Arg
 290 295 300

Tyr Gly Ile Arg Glu Asp Val Ala Leu Cys Leu Ala Arg Ala Phe Asp
 305 310 315 320

Gly Ser Ile Ser Met Ile Ala Thr Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Lys Asp
 325 330 335

Val Cys Pro Asp Leu Thr Leu Glu Glu Ala Lys Ser Val Asn Arg Thr
 340 345 350

Leu Ala Thr Leu Ile Asp Glu His Gly Leu Ser Pro Asp Ala Ala Asp
 355 360 365

Glu Leu Ile Glu His Phe Glu Ser Ile Ala Gly Ile Leu Ala Thr Asp
 370 375 380

Leu Glu Glu Ile Glu Arg Met Tyr Glu Glu Gly Arg Leu Ser Glu Glu
 385 390 395 400

Ala	Tyr	Arg	Ala	Ala	Val	Glu	Ile	Gln	Leu	Ala	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	
				405					410					415		
Glu	Gly	Val	Gly	Arg	Lys	Thr	Ala	Glu	Arg	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Gly	
			420					425					430			
Asn	Pro	Glu	Arg	Val	Lys	Gln	Leu	Ala	Arg	Glu	Phe	Glu	Ile	Glu	Lys	
		435					440					445				
Leu	Ala	Ser	Val	Glu	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Leu	Arg	Ser	Leu	Val	
	450					455					460					
Pro	Gly	Tyr	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Ile	Arg	Gly	Ile	Asp	Arg	Glu	Arg	
465					470					475					480	
Ala	Glu	Arg	Leu	Leu	Lys	Lys	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ser	Lys	Val	Arg	Glu	
				485					490					495		
Ala	Gly	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Ala	Gln	Ile	
		500						505					510			
Arg	Glu	Leu	Lys	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ser	Ile	Val	Gly	Asp	Leu	
		515					520					525				
Glu	Lys	Ala	Asp	Glu	Leu	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	
	530					535					540					
Arg	Arg	Leu	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Phe	Ser	Asp	Asp	
545					550					555					560	
Glu	Ile	Ala	Glu	Ile	Lys	Gly	Ile	Pro	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Ala	Phe	
				565					570					575		
Asp	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ser	Leu	Lys	
			580					585					590			

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Ser Tyr Asp Asp Leu Leu Glu Leu Gly Ala
 595 600 605
 Thr Pro Lys Ala Ala Ala Glu Ile Lys Gly Pro Glu Phe Lys Phe Leu
 610 615 620
 Leu Asn Ile Glu Gly Val Gly Pro Lys Leu Ala Glu Arg Ile Leu Glu
 625 630 635 640
 Ala Val Asp Tyr Asp Leu Glu Arg Leu Ala Ser Leu Asn Pro Glu Glu
 645 650 655
 Leu Ala Glu Lys Val Glu Gly Leu Gly Glu Glu Leu Ala Glu Arg Val
 660 665 670
 Val Tyr Ala Ala Arg Glu Arg Val Glu Ser Arg Arg Lys Ser Gly Arg
 675 680 685
 Gln Glu Arg Ser Glu Glu Glu Trp Lys Glu Trp Leu Glu Arg Lys Val
 690 695 700
 Gly Glu Gly Arg Ala Arg Arg Leu Ile Glu Tyr Phe Gly Ser Ala Gly
 705 710 715 720
 Glu Val Gly Lys Leu Val Glu Asn Ala Glu Val Ser Lys Leu Leu Glu
 725 730 735
 Val Pro Gly Ile Gly Asp Glu Ala Val Ala Arg Leu Val Pro Gly Tyr
 740 745 750
 Lys Thr Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr Pro Ala Glu Ala Glu Arg Val
 755 760 765
 Leu Lys Arg Tyr Gly Ser Val Ser Lys Val Gln Glu Gly Ala Thr Pro
 770 775 780
 Asp Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Ile Ala Arg Ile
 785 790 795 800
 Leu Gly Leu Arg Ser Leu Val Asn Lys Arg Leu Asp Val Asp Thr Ala
 805 810 815
 Tyr Glu Leu Lys Arg Arg Tyr Gly Ser Val Ser Ala Val Arg Lys Ala
 820 825 830
 Pro Val Lys Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Ser Asp Arg Lys Ile Ala
 835 840 845

850

855

860

Val Glu Lys Ala Glu Arg Leu Leu Glu Arg Phe Asp Thr Trp Thr Lys
865 870 875 880

Val Lys Glu Ala Pro Val Ser Glu Leu Val Arg Val Pro Gly Val Gly
885 890 895

Leu Ser Leu Val Lys Glu Ile Lys Ala Gln Val Asp Pro Ala Trp Lys
900 905 910

Ala Leu Leu Asp Val Lys Gly Val Ser Pro Glu Leu Ala Asp Arg Leu
915 920 925

Val Glu Glu Leu Gly Ser Pro Tyr Arg Val Leu Thr Ala Lys Lys Ser
930 935 940

Asp Leu Met Arg Val Glu Arg Val Gly Pro Lys Leu Ala Glu Arg Ile
945 950 955 960

Arg Ala Ala Gly Lys Arg Tyr Val Glu Glu Arg Arg Ser Arg Arg Glu
965 970 975

Arg Ile Arg Arg Lys Leu Arg Gly
980

<210> 3

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio H de la topoisomerasa V de Methanopyrus kandleri

<400> 3

Trp Lys Glu Trp Leu Glu Arg Lys Val Gly Glu Gly Arg Ala Arg Arg
1 5 10 15

Leu Ile Glu Tyr Phe Gly Ser Ala Gly Glu Val Gly Lys Leu Val Glu
20 25 30

Asn Ala Glu Val Ser Lys Leu Leu Glu Val Pro Gly Ile Gly Asp Glu
 35 40 45

Ala Val Ala Arg Leu Val Pro Gly
 50 55

<210> 4
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio I de la topoisomerasa V de Methanopyrus kandleri

Tyr Lys Thr Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr Pro Ala Glu Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Val Leu Lys Arg Tyr Gly Ser Val Ser Lys Val Gln Glu Gly Ala Thr
 20 25 30

Pro Asp Glu Leu Arg Glu Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Ile Ala Arg
 35 40 45

Ile Leu Gly
 50

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 5

Ala Tyr Asp Val Gly Ala
 1 5

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 6

Gly Thr Gly Ser Gly Ala
 1 5

<210> 7

<211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador 3
 <400> 7
 gccgggatcc ttaatgatgatg gcc 34

10 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador 1

<400> 8
 Gcgtatgatg tggcgccgg 20

20 <210> 9
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador 2

<400> 9
 30 Ggcaccggct ctggcgctg gaaagaatgg ctggaacg 38

<210> 10
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos sintética

40 <400> 10

Gly Thr Gly Ser Gly Ala
1 5

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador 4

<400> 11
 Ccgtctccgg gagctgcatg tg 22

50 <210> 12
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador 5

60 <400> 12

ggcgcccaca tcatacgctt tgattgtgaa tgtgtcattca acc 43

5 <210> 13
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador 6

<400> 13
Ggcgccagag ccggtgcctt tgattgtgaa tgtgtcatca acc 43

15 <210> 14
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido de 15 pares de bases

<400> 14
Gatcacagtg agtac 15

25 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido de 21 pares de bases

35 <400> 15
tctattgtac tcactgtgat c 21

<210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

45 <400> 16
gtttccag tcacgac 17

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador pT7-N

<400> 17
ccgtctccgg gagctgcatg tg 22

60 <210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> cebador sp4+10	
5	<400> 18 ccggatgaca gcaggcagtg acagtc	26
	<210> 19	
	<211> 25	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador sp10+7	
15	<400> 19 Ggtaagttag tagaaggtag tccag	25

REIVINDICACIONES

1- Quimera de ADN polimerasa que comprende:

- 5 una secuencia de aminoácidos que codifica para una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (a), enlazada por su extremo C-terminal a una secuencia de aminoácidos conectados (b) enlazada por su extremo C-terminal a una secuencia de aminoácidos que comprende, al menos, un dominio hélice-gancho-hélice (HhH) (c).
- 10 2- La quimera de ADN polimerasa conforme a la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos de (c) comprende, al menos, un dominio HhH de una proteína que se selecciona de la lista que comprende:
 - topoisomerasa V de *Methanopyrus Kandleri*,
 - MutY, Nth, MutM/Fpg, Nei, UvrC, DinP, RecR, UmuC, DnaE o DnIJ de *Escherichia coli*,
 - RAD1, RAD2, RAD10, RAD27, RAD 55, RAD 57, REV1, OGG1, NTG1, NTG2, DIN-7 o EXO-1 de levaduras, o
 - 15 - una proteína homóloga de las anteriores en *Bacillus subtilis*, *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus influenzae*, *Methanococcus jannaschii*, *Micrococcus luteus*, *Methanobacterium thermoformicum* o *Salmonella typhimurium*.
- 20 3- La quimera de ADN polimerasa conforme a la reivindicación 2, donde la secuencia de aminoácidos de (c) comprende, al menos, un dominio HhH derivado de la topoisomerasa V de *Methanopyrus kandleri*.
4. La quimera de ADN polimerasa conforme a la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos de (c) es SEQ ID NO: 3.
- 25 5. La quimera de ADN polimerasa conforme a la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos de (c) es SEQ ID NO: 3 enlazada por su extremo C-terminal a la SEQ ID NO: 4.
6. La quimera de ADN polimerasa conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la secuencia de aminoácidos conectados (b) es SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.
7. La quimera de ADN polimerasa conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ de (a) se selecciona entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o ABV.
- 30 8. La quimera de ADN polimerasa conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ de (a) tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 80% con SEQ ID NO: 1.
9. La quimera de ADN polimerasa conforme a la reivindicación 8, donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ de (a) tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 35 10. La quimera de ADN polimerasa conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ de (a) tiene una modificación en el dominio de la exonucleasa y donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos de un 10% de actividad de la exonucleasa que la ADN polimerasa correspondiente de origen natural.
- 40 11. La quimera de ADN polimerasa conforme a la reivindicación 10, donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ de (a) tiene menos del 1% de la actividad de la exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
12. La quimera de ADN polimerasa conforme a reivindicación 11, donde la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada de (a) carece de actividad detectable de la exonucleasa con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
- 45 13. Uso de la quimera de ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.
14. Método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:
 - a) la quimera de ADN polimerasa de la invención,
 - 50 b) un tampón,
 - c) cloruro magnésico,
 - d) un cebador, y
 - e) nucleósido trifosfatos.

15. Método según la reivindicación 14, donde la mezcla de reacción además comprende monolaurato de sorbitán polioxietilenado
- 5 16. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, donde la mezcla de reacción comprende además una sal de amonio.
17. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la mezcla de reacción comprende además una sal de potasio.
- 10 18. Método conforme a la reivindicación 17, donde la sal de potasio es cloruro de potasio o acetato de potasio.
19. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción.
- 15 20. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.
21. Método conforme a la reivindicación 20, donde la sal de amonio es sulfato de amonio.
- 20 22. Método conforme a la reivindicación 21, donde el sulfato de amonio se encuentra en una concentración entre 30 mM y 60 mM.
23. Método conforme a la reivindicación 20, donde la sal de amonio es cloruro de amonio o acetato de amonio.
- 25 24. Método conforme a la reivindicación 23, donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio se encuentra en una concentración entre 60 mM y 120 mM.
25. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, donde el tampón es tris-clorhídrico, tris-acético o HEPES.
- 30 26. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25, donde el tampón equivale a un PH entre 7,0 y 8,5.
27. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, donde el cloruro magnésico está en una concentración entre 2 mM y 20 mM.
- 35 28. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, donde el cloruro magnésico o el acetato potásico se encuentra en una concentración entre 30 mM y 70 mM.
29. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 28, donde los nucleósido trifosfatos son dCTP, dGTP, dTTP y dATP.
- 40 30. Método conforme a la reivindicación 29, donde los nucleósido trifosfatos dCTP, dGTP, dTTP y dATP están en cantidades equimolares.
31. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 30, donde el cebador es arbitrario y está protegido frente a la acción de las exonucleasas.
- 45 32. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 31, donde el ADN patrón es el ADN plasmídico o el ADN genómico.
- 50 33. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 32, donde la amplificación se realiza a una temperatura esencialmente constante entre 25 y 40° C.
34. Método para ampliar un ADN patrón conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 33, donde la amplificación tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).
- 55 35. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 34, donde al menos un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.
- 60 36. Kit para llevar a cabo un método conforme a las reivindicaciones 14 a 35 que comprende:
a) la quimera de ADN polimerasa conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12,
b) un tampón, y
c) cloruro de magnesio.

- 5 37. Kit conforme a la reivindicación 36, que comprende además monolaurato de sorbitán polioxietilenado.
38. Kit conforme a cualquiera de las reivindicaciones 36 ó 37, que comprende además una sal de amonio.
39. Kit conforme a cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, que comprende además una sal de potasio.
40. Kit conforme a cualquiera de las reivindicaciones 36 ó 39, que comprende además un cebador.
- 10 41. Kit conforme a cualquiera de las reivindicaciones 36 a 40, que comprende además el cebador conforme a la reivindicación 31.
42. Kit conforme a cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41, que comprende además los nucleósido trifosfatos.
- 15 43. Kit conforme a cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, donde al menos un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

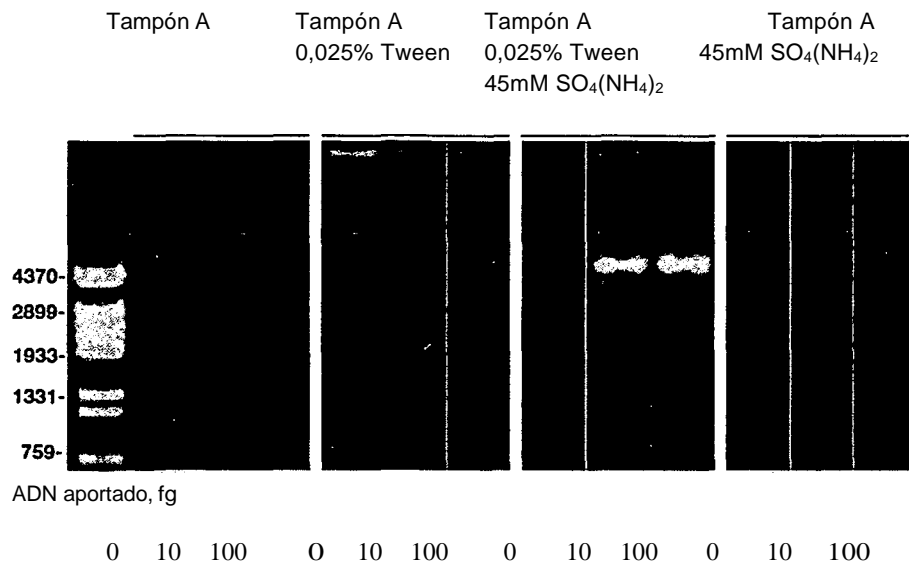


Figura 1

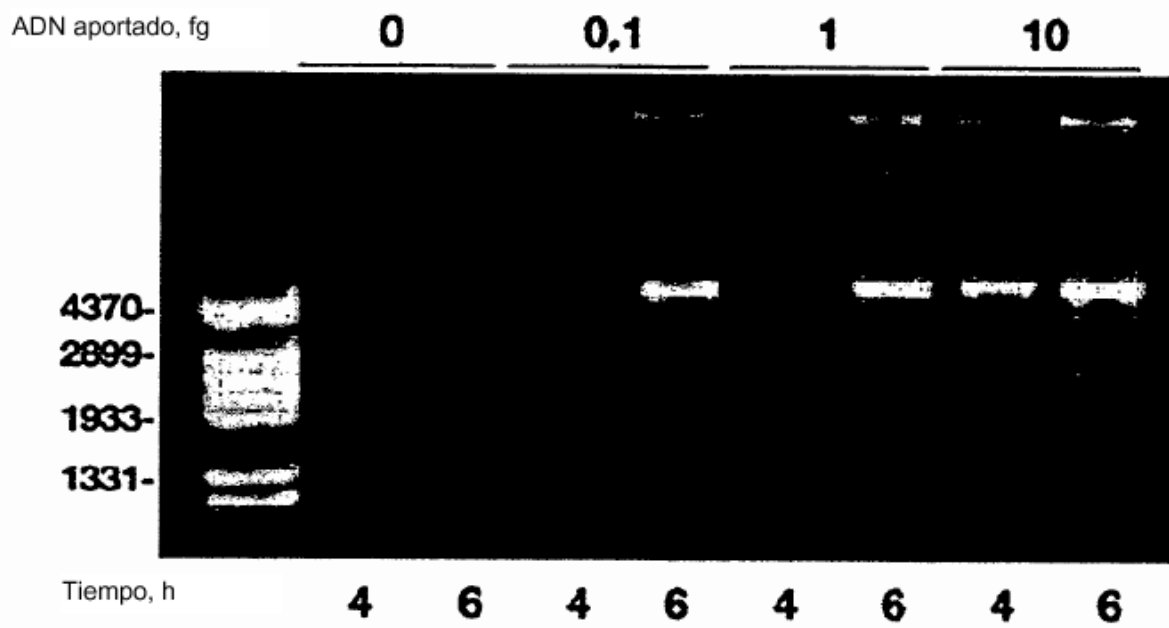


Figura 2

Sal de amonio	Sulfato de amonio				Cloruro de amonio				Acetato de amonio			
	(45mM)				(90mM)				(90mM)			
ADN aportado, fg	0	0,1	1	10	0	0,1	1	10	0	0,1	1	10

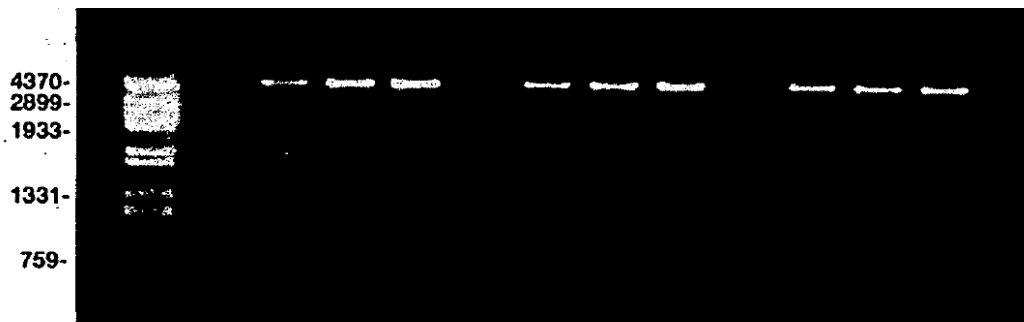
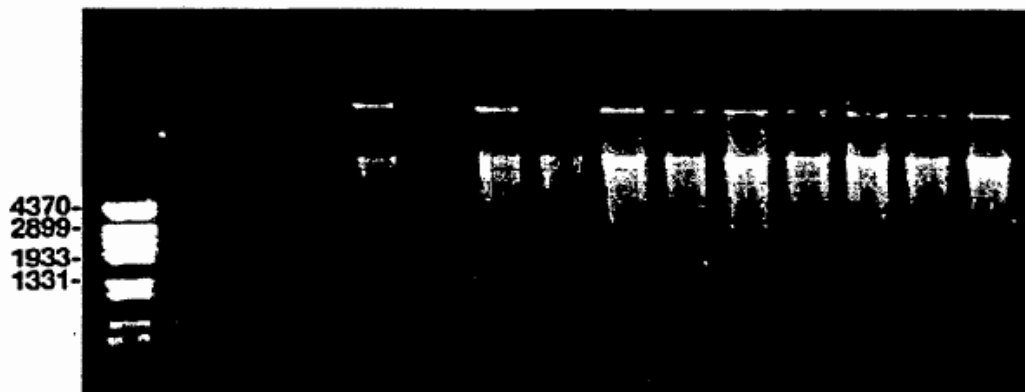


FIG. 3

ADN aportado, fg	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
------------------	---	----	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------



Tiempo, horas	4	6	4	6	4	6	4	6	4	6	4	6
---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

FIG. 4

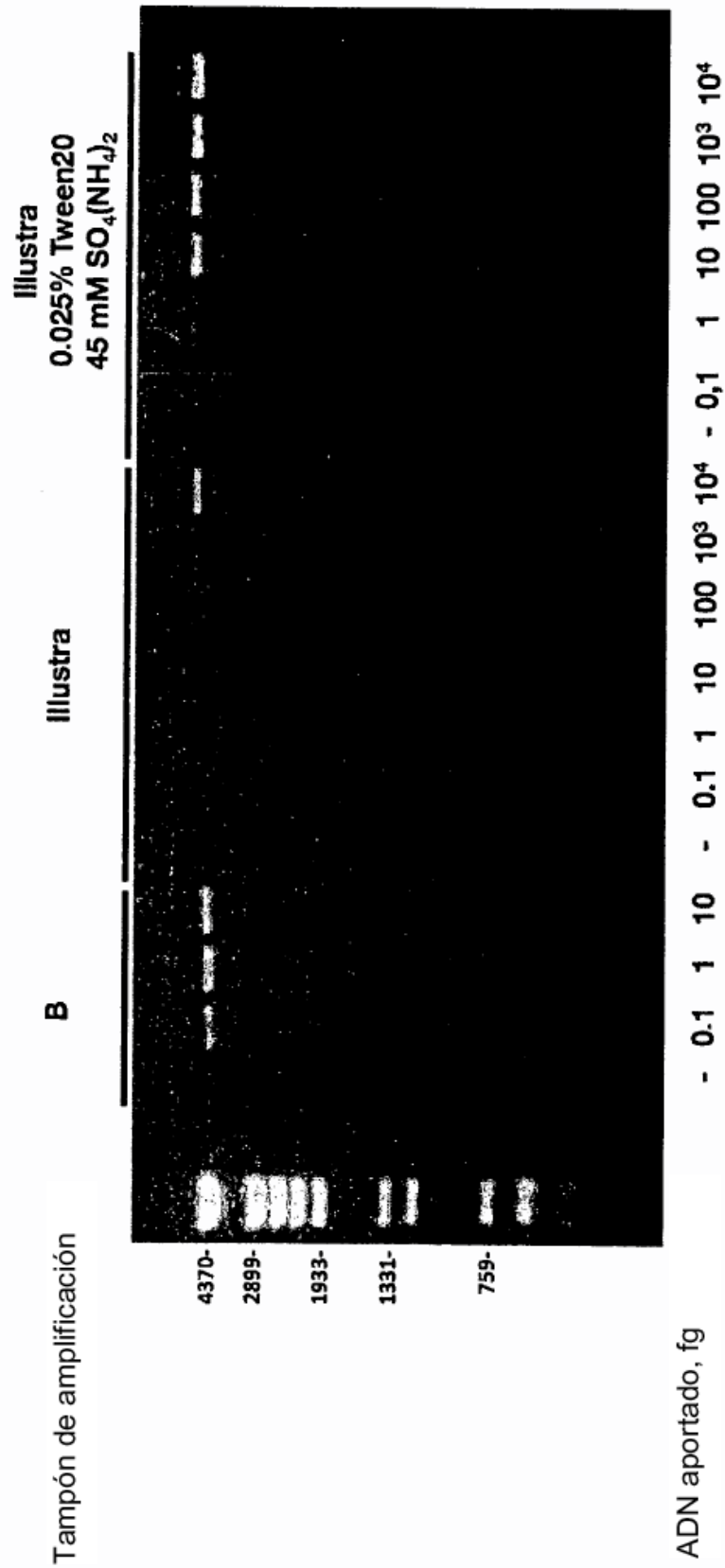
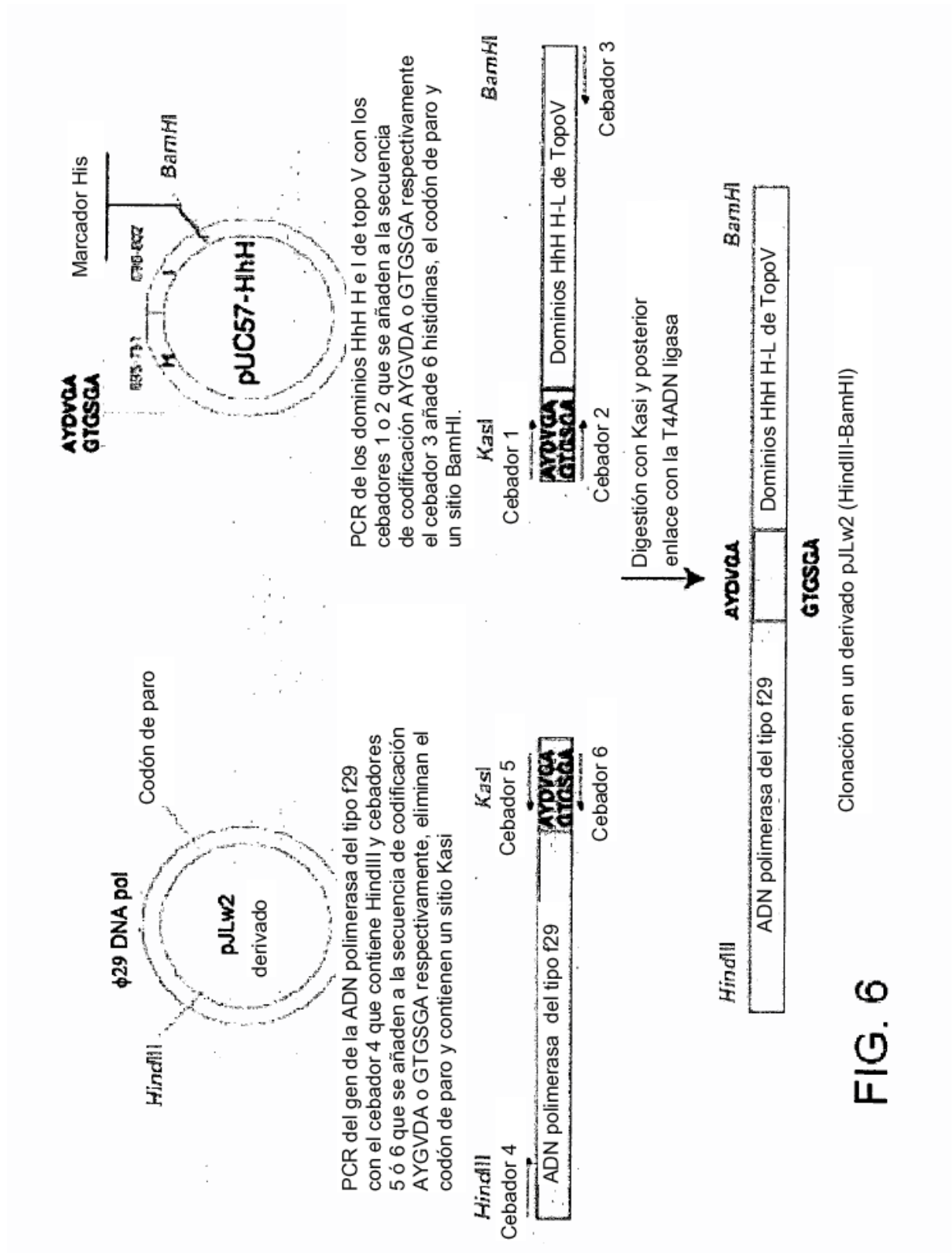


FIG. 5



ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ natural

Complejo ADNpol/ADN
ADN libre

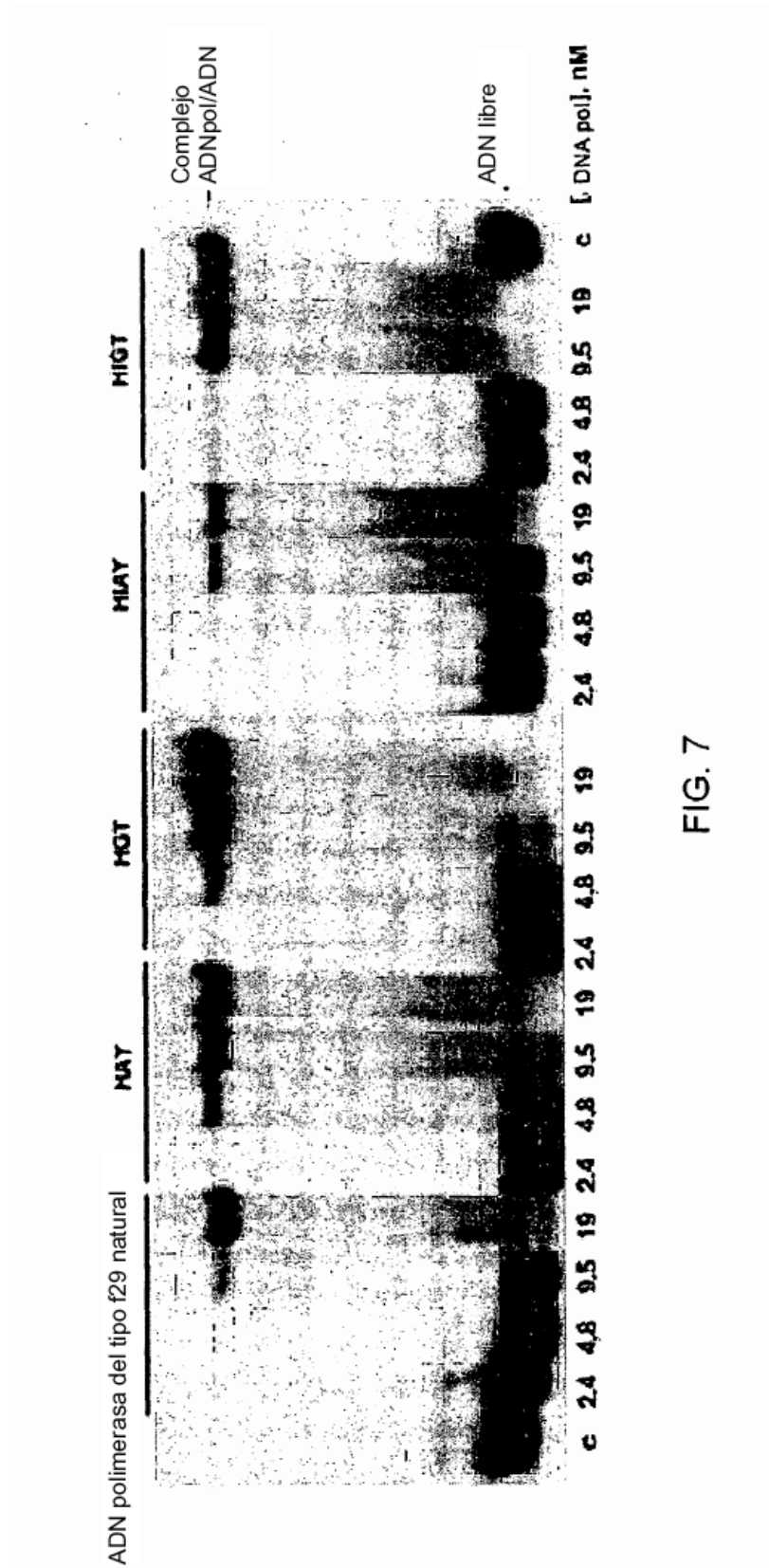


FIG. 7

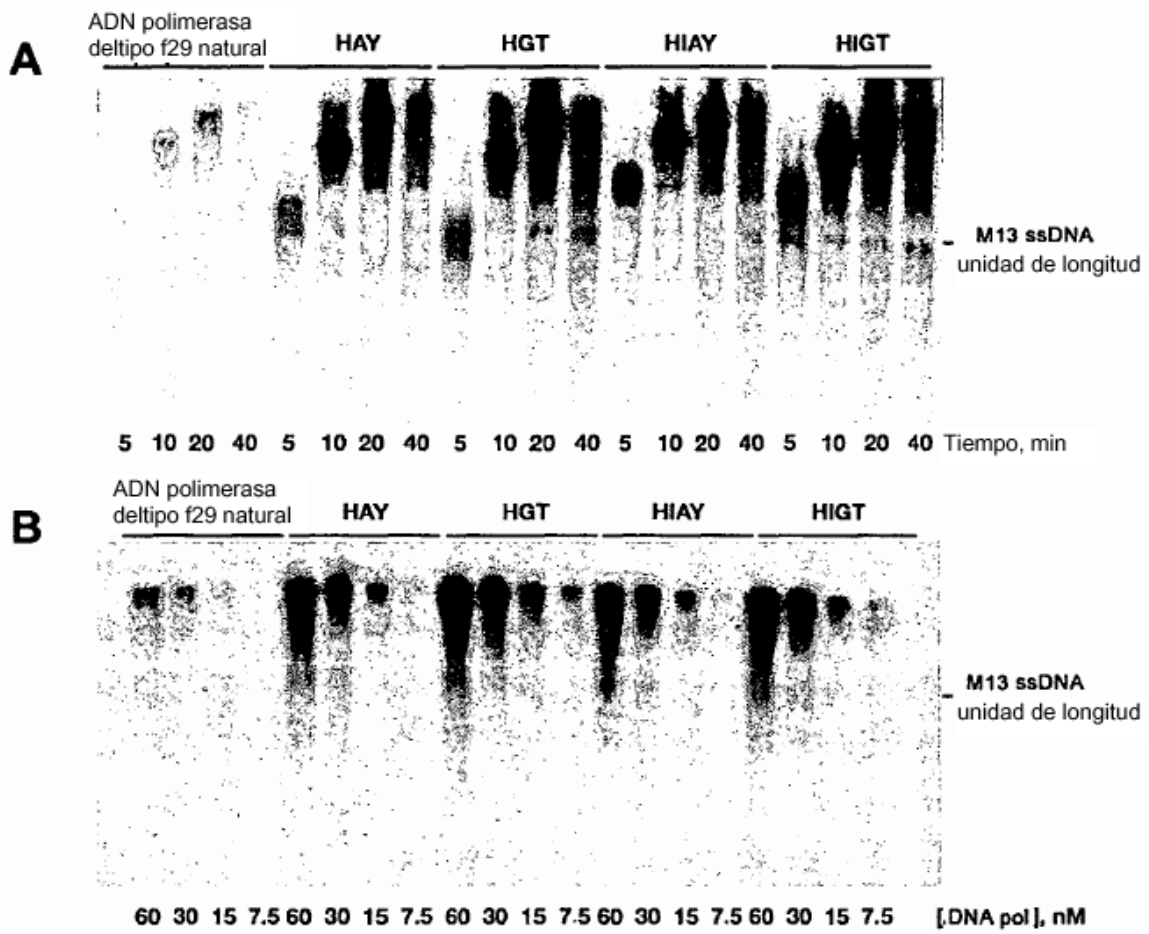
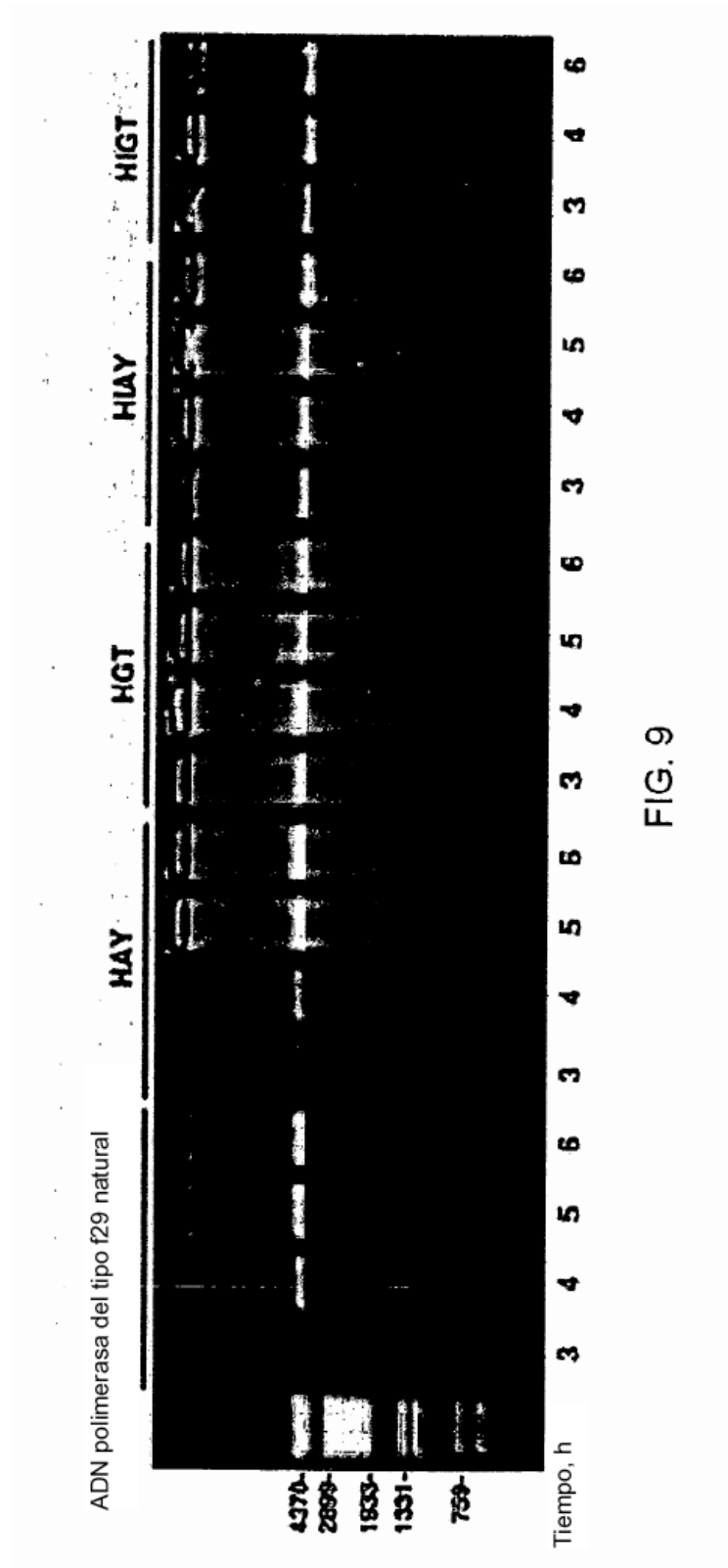


FIG. 8



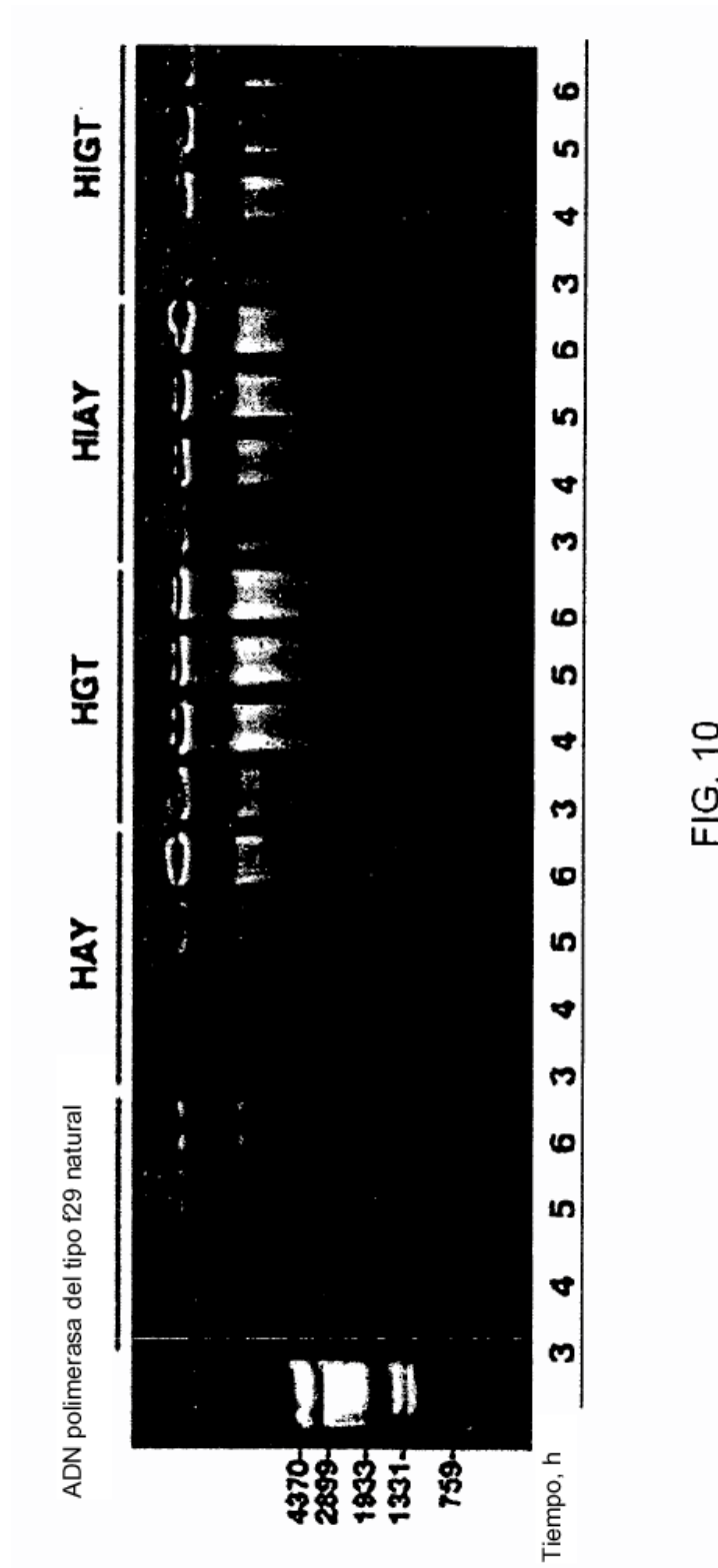


FIG. 10